

repository.ub.ac.id

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) dan Pengaruhnya terhadap Kadar Malondialdehid pada Pankreas Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi MLD-STZ

SKRIPSI

oleh:

RESTI RACHMAWANTI

145090201111029



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018



repository.ub.ac.id

**Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Akar Pletekan
(*Ruellia tuberosa* L.) dan Pengaruhnya terhadap Kadar
Malondialdehid pada Pankreas Tikus Putih (*Rattus
norvegicus*) yang Diinduksi MLD-STZ**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Kimia

oleh:

RESTI RACHMAWANTI

145090201111029



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) dan Pengaruhnya terhadap Kadar Malondialdehid pada Pankreas Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi MLD-STZ

oleh:

RESTI RACHMAWANTI

145090201111029

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal **16 JUL 2018**
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Anna Roosdjana, M.App.Sc

NIP. 19580711 199203 2 002

Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, MS

NIP. 19520412 198002 1 001



Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D

NIP. 19731020 200212 1 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : RESTI RACHMAWANTI

NIM : 145090201111029

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

“Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) dan Pengaruhnya terhadap Kadar Malondialdehid pada Pankreas Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi MLD-STZ”

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi saya yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran.

Malang 06 JUL 2018
Yang menyatakan,



Resti Rachmawanti
NIM. 145090201111029

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) dan Pengaruhnya terhadap Kadar Malondialdehid pada Pankreas Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi MLD-STZ

ABSTRAK

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, gangguan kerja insulin atau keduanya, yang menimbulkan berbagai komplikasi kronik pada mata, ginjal, saraf, dan pembuluh darah. Gangguan kerja insulin terjadi pada DM tipe 1, utamanya disebabkan oleh defisiensi insulin. Defisiensi insulin dapat menyebabkan gangguan metabolisme lipid, protein dan glukosa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekstrak etanol akar pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) aktif sebagai antioksidan yang dinyatakan dengan IC_{50} dengan metode DPPH dan mengetahui potensi terapinya terhadap kadar malondialdehid (MDA) pada pankreas tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi MLD-STZ dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah nilai aktivitas antioksidan (IC_{50}) dan kadar malondialdehid. Ekstrak etanol akar pletekan diuji aktivitas antioksidannya dengan senyawa pembanding yaitu vitamin C dengan metode DPPH sebagai model radikal bebas. Pengukuran kadar malondialdehid diukur menggunakan reagen TBA dengan metode spektrofotometri Vis. Hasil uji aktivitas antioksidan diketahui nilai IC_{50} ekstrak etanol akar pletekan sebesar 2,484 $\mu\text{g/mL}$ dan vitamin C sebesar 3,184 $\mu\text{g/mL}$. Hasil penelitian menunjukkan pemberian terapi ekstrak etanol akar pletekan dengan dosis 250 mg/kg BB dapat menurunkan secara signifikan ($p < 0,01$) kadar malondialdehid pankreas tikus DM sebesar 50,55%.

Kata kunci: aktivitas antioksidan, diabetes melitus, malondialdehid, pankreas, pletekan, radikal bebas, streptozotocin (STZ)

Antioxidant Activity Test of Ethanol Extract of *Ruellia tuberosa* Roots and It's Effect on Malondialdehyde Levels in Pancreatic Rats (*Rattus norvegicus*) Induced by MLD-STZ

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by hyperglycemia that occurs due to insulin secretion abnormalities, insulin disruption or both, leading to chronic complications in the eyes, kidneys, nerves and blood vessels. Insulin disruption occurs in type 1 diabetes, primarily caused by insulin deficiency. Insulin deficiency can cause disorders of lipid metabolism, protein, and glucose. The aim of this research was to investigate ethanol extract of *Ruellia tuberosa* roots active as antioxidant which stated by IC_{50} with DPPH method and to investigate the therapeutic potential on the level of malondialdehyde (MDA) in rats (*Rattus norvegicus*) pancreas induced MLD-STZ dose of 20 mg/kg BW for 5 days successively. The parameters observed in this study were the value of antioxidant activity (IC_{50}) and malondialdehyd levels. Ethanol extract of *Ruellia tuberosa* roots tested it's antioxidant activity with compared to vitamin C with DPPH method as free radical model. Malondialdehyde level was measured using TBA reagent by spectrophotometric Vis method. The result of antioxidant activity test showed that IC_{50} value of ethanol extract of *Ruellia tuberosa* roots was 2.484 $\mu\text{g/mL}$ and vitamin C 3.184 $\mu\text{g/mL}$. While the treatment of ethanol extract of *Ruellia tuberosa* roots with dose 250 mg/kg BW showed significant ($p < 0,01$) to reduce the malondialdehyde level of DM pancreas rat up to 50.55%.

Keyword: antioxidant activity, diabetes mellitus, malondialdehyde, pancreas, pletekan, free radicals, streptozotocin (STZ)

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah S.W.T yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul **“Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) dan Pengaruhnya terhadap Kadar Malondialdehid pada Pankreas Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi MLD-STZ”** yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW dan umatnya hingga akhir zaman, amin.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis tidak terlepas dari bimbingan serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

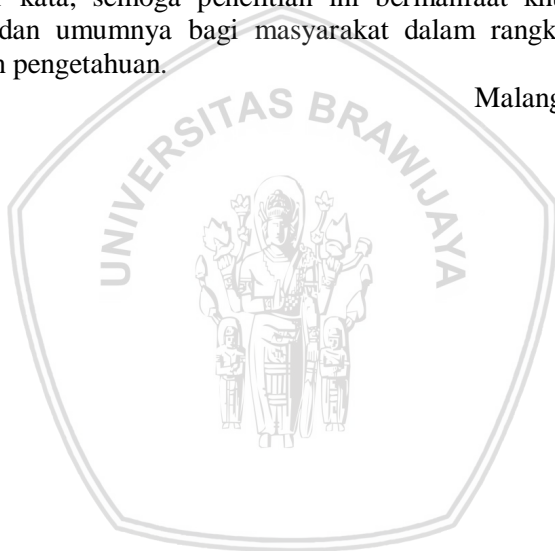
1. Masruri, S.Si.,M.Si.,Ph.D selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.
2. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc dan Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS selaku dosen pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan masukan dan nasehat selama proses penelitian hingga akhir.
3. Anna Safitri, S.Si., M.Sc.,Ph.D yang selalu memberikan saran dan dukungan selama masa penelitian dan penyusunan skripsi ini.
4. Bapak Bambang Irwantono dan Ibu Diana Dewi selaku kedua orang tua penulis yang selalu mendoakan, memberikan dukungan baik moril maupun materil, nasehat, masukan, dan semangat kepada penulis selama masa studi.
5. PLP Lab. Biokimia Bapak Maryono yang telah membantu penulis selama pengerjaan penelitian di Lab. Biokimia.
6. Rekan Lab. Biokimia dan rekan tim penelitian Diabetes Melitus, Cindy Alvionita, Siti Sumadyah, Ningrum Arrohmah, Pretty Septiana, Zulfatul Muzayyana dan Istoria Rosyada yang selalu memberikan semangat dan dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Yohanes Elfin Purnomo yang senantiasa membantu dan memberikan semangat dalam menyelesaikan skripsi.

8. Seluruh Staf dan Karyawan Laboratorium Biokimia FMIPA dan Biosains Universitas Brawijaya yang telah membantu proses penelitian.
9. Seluruh rekan-rekan kimia angkatan 2014, khususnya Ridha Dini Rahmawati, Anindia Nurul, Hafid Bramantyo, Dianisari yang selalu memberikan semangat dan masukan.
10. Rekan kos Pak Jumadi, Siti Silahturrohman, Siwi Oktafia, Denas Elian dan Nurul A'yun yang selalu memberikan semangat dan masukan.

Akhir kata, semoga penelitian ini bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi masyarakat dalam rangka menambah wawasan pengetahuan.

Malang, Juli 2018

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Diabetes Melitus Tipe 1 (DMT 1)	5
2.2 Radikal Bebas	5
2.3 Streptozotocin (STZ)	6
2.4 Antioksidan	7
2.5 Uji Aktivitas Antioksidan	8
2.6 <i>Ruellia tuberosa</i> L.	9
2.7 Fitosterol	10
2.8 Flavonoid	11
2.9 Triterpenoid (Lupeol)	12
2.10 Vitamin C	13
2.11 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	13
2.12 Pankreas	15
2.13 Malondialdehid (MDA)	16
2.14 Hipotesis Penelitian	18
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	19
3.2 Alat Penelitian	19
3.3 Bahan Penelitian	19

3.4 Tahapan Penelitian	20
3.5 Prosedur Penelitian	20
3.5.1 Pembuatan ekstrak etanol akar pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.) dan penentuan dosis terapi	20
3.5.2 Pembuatan larutan ekstrak etanol akar pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.)	21
3.5.3 Pembuatan larutan pembanding vitamin C standar	21
3.5.4 Pembuatan larutan DPPH (1,1 <i>diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>)	21
3.5.5 Pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH	21
3.5.6 Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol akar pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.)	22
3.5.7 Pengukuran aktivitas antioksidan larutan pembanding vitamin C standar	22
3.5.8 Preparasi hewan coba	22
3.5.9 Pengukuran kadar glukosa darah pada hewan coba	23
3.5.10 Pembuatan larutan natrium sitrat 0,2 M sebanyak 100 mL	23
3.5.11 Pembuatan larutan asam sitrat 0,2 M sebanyak 100 mL	24
3.5.12 Pembuatan buffer sitrat 0,2 M dengan pH 4,5	24
3.5.13 Pembuatan dan injeksi MLD-STZ	24
3.5.14 Terapi ekstrak etanol akar tanaman pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.)	25
3.5.15 Pembedahan dan pengambilan pankreas tikus	25
3.5.16 Pembuatan kurva standar malondialdehid (MDA)	25
3.5.17 Pengukuran kadar malondialdehid (MDA)	26
3.5.18 Analisis data	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Akar Pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.)	27
4.2 Profil Malondialdehid (MDA) pada Pankreas Tikus	29

Hasil Induksi MLD-SIZ dan Terapi Ekstrak Etanol
Akar Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.)

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan 35

5.2 Saran 35

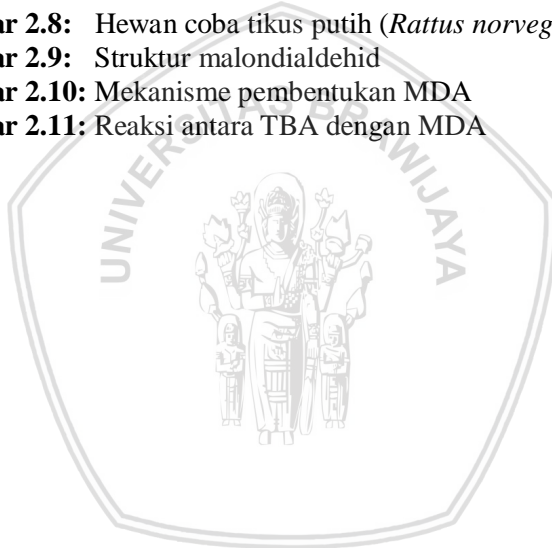
DAFTAR PUSTAKA 37

LAMPIRAN 47



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1:	Struktur kimia streptozotocin	7
Gambar 2.2:	Reaksi DPPH dan antioksidan	8
Gambar 2.3:	Tanaman pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.)	9
Gambar 2.4:	Struktur umum kampesterol, stigmasterol dan β -sitosterol	11
Gambar 2.5:	Struktur umum flavonoid, isoflavonoid dan neoflavonoid	12
Gambar 2.6:	Struktur umum lupeol	12
Gambar 2.7:	Struktur vitamin C	13
Gambar 2.8:	Hewan coba tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	13
Gambar 2.9:	Struktur malondialdehid	16
Gambar 2.10:	Mekanisme pembentukan MDA	17
Gambar 2.11:	Reaksi antara TBA dengan MDA	18



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1: Nilai IC_{50} (inhibitory concentration) ekstrak etanol akar pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.) dan vitamin C	28
Tabel 4.2: Rata-rata kadar MDA pankreas tikus	30



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Surat Determinasi Tanaman Akar Pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.)	47
Lampiran B. Sertifikat Laik Etik	48
Lampiran C. Skema Penelitian	49
Lampiran D. Hasil Uji LCMS dan Fitokimia Ekstrak Etanol Akar Pletekan (<i>R. tuberosa</i>)	50
Lampiran E. Preparasi Larutan dan Perhitungan	51
Lampiran F. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Kualitatif dengan Metode DPPH	59
Lampiran G. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH	60
Lampiran H. Uji Aktivitas Antioksidan	61
Lampiran I. Perhitungan Persentase Aktivitas Antioksidan	62
Lampiran J. Perhitungan IC_{50}	63
Lampiran K. Kurva Baku Larutan Malondialdehid (MDA)	65
Lampiran L. Data Absorbansi MDA Organ Pankreas	66
Lampiran M. Perhitungan Kadar MDA	66
Lampiran N. Data Glukosa Darah Tikus Setelah 3 Minggu Terapi Ekstrak Etanol Akar Pletekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.)	69
Lampiran O. Hasil Analisa Statistika Kadar MDA Pankreas Tikus	69

DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

Simbol/singkatan	Keterangan
µg	microgram
ADA	American Diabetes Association
ADP	Adenosin Pospat
ALT	Alanine Aminotransminase
ANOVA	Analysis of Variance
AST	Aspartate transminase
ATP	Adenosin Tri Posfat
bb	Berat Badan
BHA	Butil Hidroksi Anisol
BHT	Butil Hidroksi Toluen
BNJ	Beda Nyata Jujur
dL	deciliter
DM	Diabetes Melitus
DMT 1	Diabetes Melitus Tipe 1
DNA	Deoxyribose-nucleic Acid
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl
GLUT 2	Glucose Transporters 2
GLUT 4	Glucose Transporters 4
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.p	intraperitorial
<i>IC</i> ₅₀	The half maximal inhibition concentration
IR	Inframerah
LCMS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
MDA	Malondialdehyde
mg	miligram
mL	mililiter
MLD	Multiple Low Dose
MS	Mass Spectrometry
NAD ⁺	Nikotinamida Adenina Dinukleotida
Na-Thio	Natrium Thiobarbituric
NO	Nitrogen Monoksida
Ph	potensial Hidrogen
PUFA	Poly Unsaturated Fatty Acid
ROS	Reactive Oxygen Spesies
STZ	Streptozotocin

TBA
TBHQ
TCA
UV
Vis
 β
 λ

Thiobarbituric Acid
Tert-Butil Hidroksi Quinon
Tri Chloro Asetate
Ultraviolet
Visibel
Beta
Lamda



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus adalah salah satu penyakit metabolik, yang ditandai dengan meningkatnya glukosa darah. Penderita diabetes melitus di Indonesia pada tahun 2000 mencapai 8,4 juta orang dan menduduki peringkat keempat setelah India, Cina dan Amerika Serikat. Jumlah tersebut diperkirakan akan meningkat lebih dari dua kali lipat pada tahun 2030 yang mencapai 21,3 juta orang [1]. Diabetes melitus ditandai adanya kadar glukosa darah yang melebihi normal (hiperglikemia) sebagai akibat dari tubuh yang kekurangan insulin relatif maupun absolut [2].

Hiperglikemia pada diabetes melitus dapat menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas dan perkembangan dari stres oksidatif [3]. Stres oksidatif adalah peristiwa dimana radikal bebas yang berupa molekul reaktif, yang muncul melalui suatu reaksi biokimiawi dari sel normal merusak membran sel dan menyebabkan berbagai gangguan fungsi tubuh [4]. Radikal bebas dalam tubuh akan menyebabkan kerusakan DNA, karbohidrat, protein dan lipid [5]. Stres oksidatif dapat ditunjukkan dengan meningkatnya malondialdehid (MDA) serum maupun jaringan. Malondialdehid terbentuk dari peroksidasi lipid (*lipid peroxidation*) pada membran sel yaitu reaksi radikal bebas (radikal hidroksil) dengan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA). Peningkatan MDA ini menandakan adanya proses peroksidasi lemak yang berpotensi besar terjadinya komplikasi baik mikro maupun makrovaskular [6].

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghambat laju oksidasi molekul lain atau menetralkan radikal bebas [7]. Antioksidan dapat diperoleh dalam bentuk sintetik dan alami. Namun dalam bentuk sintetik dikhawatirkan akan terjadi efek samping sehingga menjadikan antioksidan alami menjadi alternatif yang terpilih. Antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan oleh spesies oksigen reaktif, mampu menghambat penyakit degeneratif dan menghambat peroksidasi lipid pada makanan. Tumbuhan merupakan sumber antioksidan alami dan umumnya merupakan senyawa fenolik yang tersebar pada bagian tumbuhan baik pada kayu, biji, daun, buah, akar, bunga maupun serbuk sari [8,9].

Indonesia memiliki keanekaragaman flora yang sangat melimpah yang bisa dijadikan sebagai sumber bahan baku obat tradisional. Salah satu tumbuhan yang bisa dimanfaatkan dan sebagai sumber senyawa bioaktif adalah dari famili *Acanthaceae* antara lain *Ruellia tuberosa* L. [10]. *R. tuberosa* adalah tumbuhan tropis yang tersebar secara luas di Asia Tenggara yang mengandung senyawa alkaloid, triterpenoid atau steroid, flavonoid, fenolik, saponin, luteolin, dan sebagainya. Senyawa bioaktif jenis triterpenoid dan flavonoid dapat berfungsi sebagai antiinflamasi, antiurolitik, antioksidan dan antidiabetik [11]. Selain itu tanaman yang mengandung fitosterol dapat berkhasiat meluruhkan kencing (diuretik) dan menurunkan kadar glukosa darah (hipoglikemik), diduga karena peran senyawa aktif diantaranya β -sitosterol dan stigmasterol [12].

Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak metanol dari daun *R. tuberosa* berpotensi sebagai protektor beta pankreas, mampu menurunkan kadar glukosa darah sehingga dapat memperbaiki sel epitel, memiliki efek antioksidan, antidiabetes, antihiperlipodemik dan hepatoprotektif dari tikus diabetes yang diinduksi aloksan dan memperbaiki kondisi organ pankreas dan hati [13,14].

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dikaji mengenai uji aktivitas ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) sebagai antioksidan dengan reagen DPPH dan pengaruh pemberian ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) terhadap kadar MDA pada jaringan organ pankreas tikus putih akibat induksi MLD-STZ.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) aktif sebagai antioksidan ?
2. Berapa nilai aktivitas antioksidan ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) yang dinyatakan dengan IC_{50} ?
3. Apakah pemberian ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) dapat menurunkan kadar malondialdehid (MDA) pada pankreas tikus akibat induksi MLD-STZ ?

1.3 Batasan Masalah

1. Akar pletekan (*R. tuberosa*) dimaserasi menggunakan etanol absolut:aquades (1:1) sebanyak 1,5 L selama 3 hari berturut-turut.
2. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar usia 2 bulan dengan berat rata-rata 200 g sebanyak 20 ekor. Penggunaan hewan coba menyertakan sertifikat laik etik No. 873-KEP-UB dari komisi etik penelitian UB.
3. Dosis STZ yang diberikan pada tikus adalah 20 mg/kg BB tikus per hari selama 5 hari berturut-turut.
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH yang dinyatakan dengan IC_{50} dan kadar malondialdehid (MDA) pada pankreas tikus yang diuji dengan reagen TBA.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) aktif sebagai antioksidan.
2. Mengetahui nilai aktivitas ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) sebagai antioksidan yang dinyatakan dengan IC_{50} .
3. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) terhadap kadar malondialdehida (MDA) pada pankreas tikus akibat induksi MLD-STZ.

1.5 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi dan wawasan terkait ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) yang berpotensi sebagai tanaman antioksidan, antidiabetik dan antiinflamasi sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan penyakit diabetes melitus.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Melitus Tipe 1 (DMT 1)

Menurut *American Diabetes Association* (ADA) [15], diabetes melitus adalah suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, gangguan kerja insulin atau keduanya, yang menimbulkan berbagai komplikasi kronik pada mata, ginjal, saraf, dan pembuluh darah. Menurut PERKENI [16], seseorang dapat didiagnosa diabetes melitus apabila mempunyai gejala klasik diabetes melitus seperti poliuria, polidipsi dan polifagi disertai dengan kadar gula darah sewaktu 200 mg/dL dan gula darah puasa ≥ 126 mg/dL.

Diabetes melitus tipe 1 disebabkan oleh kerusakan sel β pankreas sehingga kekurangan insulin absolut. Umumnya penyakit berkembang kearah ketoasidosis diabetik yang menyebabkan kematian. Pada diabetes melitus tipe ini biasanya terjadi sebelum umur 30 tahun dan harus mendapatkan insulin dari luar. Beberapa faktor resiko dalam diabetes melitus tipe ini adalah autoimun, infeksi virus dan riwayat keluarga diabetes melitus [15]. Pada DMT 1 biasanya reseptor insulin di jaringan perifer kuantitas dan kualitasnya cukup atau normal (jumlah reseptor insulin DMT 1 antara 30.000-35.000), jumlah reseptor insulin pada orang normal ± 35.000 , sedangkan jumlah reseptor insulin pada orang yang mengalami obesitas ± 20.000 [17].

Terjadinya DM tipe 1 utamanya disebabkan oleh defisiensi insulin. Defisiensi insulin dapat menyebabkan gangguan metabolisme lipid, protein dan glukosa [18]. Gangguan metabolisme lipid terjadi karena meningkatnya asam lemak bebas dan keton sehingga penggunaan glukosa berkurang dan menyebabkan hiperglikemia. Gangguan metabolisme glukosa terjadi karena peningkatan proses glukoneogenesis sehingga glukosa hepatic meningkat [18].

2.2 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya dan bersifat reaktif. Suatu atom atau molekul akan tetap stabil apabila

elektronnya berpasangan, untuk mencapai kondisi tersebut radikal bebas dapat menyerang bagian tubuh seperti sel dan dapat menyebabkan kerusakan pada sel tersebut, akibatnya pada kerja sel, jaringan proses metabolisme tubuh terganggu. Radikal bebas dapat berasal dari tubuh makhluk hidup itu sendiri sebagai akibat aktivitas tubuh seperti aktivitas autooksidasi, oksidasi enzimatis, organel subseluler, aktivitas ion logam transisi dan berbagai sistem enzim lainnya [19, 20].

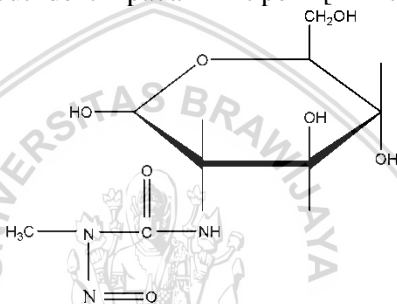
Secara umum sumber radikal bebas dapat dibedakan menjadi dua, yaitu endogen dan eksogen. Radikal bebas endogen dapat terbentuk melalui autooksidasi, oksidasi enzimatis, fagositosis dalam respirasi, oksidasi ion-ion logam transisi dan transfer elektron di mitokondria. Sedangkan radikal bebas eksogen berasal dari luar sistem tubuh, misalnya sinar UV dan aktivitas lingkungan. Terbentuknya senyawa radikal, baik radikal bebas endogen maupun eksogen terjadi melalui sederetan reaksi. Mula-mula terjadi inisiasi (pembentukan awal radikal bebas), kemudian propagasi (terbentuknya radikal baru) dan terakhir terminasi (pemusnahan atau pengubahan senyawa radikal menjadi non radikal) [21].

Radikal bebas dalam tubuh pada dasarnya berperan dalam pemeliharaan kesehatan tubuh karena sifatnya yang reaktif untuk mengikat atau bereaksi dengan molekul asing yang masuk ke dalam tubuh. Apabila radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh tidak seimbang dapat menyebabkan terganggunya sistem metabolisme, hal ini karena sifat radikal yang dapat menyerang lipid, DNA (*deoxyribonucleic acid*) dan protein komponen sel dan jaringan [20].

2.3 Streptozotosin (STZ)

Streptozotosin (STZ) atau 2-deoksi-2-[3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glukopiranosil] (**Gambar 2.1**) diperoleh dari *Streptomyces achromogenes* yang mempunyai aktivitas anti-neoplasma dan antibiotik spektrum luas. Streptozotosin dapat secara langsung merusak sel β Langerhans atau menimbulkan proses autoimun terhadap sel β sehingga lebih banyak digunakan dalam pembuatan hewan uji diabetes melitus. DM tipe 1 juga dapat dirancang pada hewan uji melalui pankreatektomi total ataupun secara genetik sehingga mengakibatkan disfungsi pankreas dalam mensekresi insulin [22,23].

Dosis yang digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 untuk intravena adalah 40-60 mg/kg BB, sedangkan dosis intraperitoneal adalah lebih dari 40 mg/kg BB. STZ dapat diberikan secara berulang untuk menginduksi DM tipe 1 yang diperantarai aktivasi sistem imun. Untuk menginduksi DM tipe 2, dosis yang digunakan untuk intravena atau intraperitoneal STZ adalah 100 mg/kg BB pada tikus yang berumur 2 hari, pada 8-10 minggu tikus tersebut akan mengalami gangguan respon terhadap glukosa dan sensitivitas sel β terhadap glukosa. Di lain pihak, sel α dan δ tidak dipengaruhi secara signifikan oleh pemberian streptozotosin pada neonatal tersebut sehingga tidak membawa dampak pada perubahan glukagon dan somatostatin. Patofisiologis tersebut identik pada DM tipe II [24-27].



Gambar 2.1 Struktur kimia streptozotosin

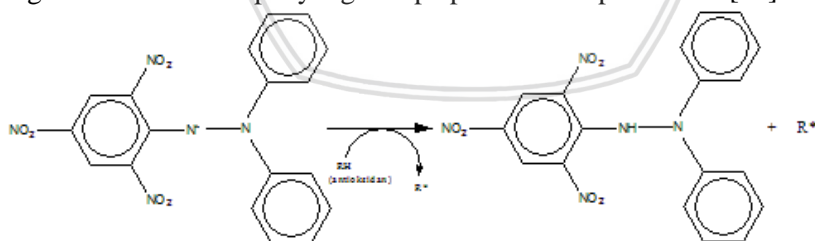
2.4 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) yang mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal [3]. Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan diklasifikasikan menjadi dua kategori, yaitu antioksidan pencegah dan antioksidan pemutus rantai. Antioksidan pencegah bekerja dengan menghambat pembentukan *reactive oxygen species* (ROS), contohnya enzim katalase, peroksidase, superoksida dismutase dan transferin sedangkan antioksidan pemutus rantai merupakan senyawa yang menangkap radikal oksigen kemudian memutus rangkaian rantai reaksi radikal, contohnya vitamin C, vitamin E, asam urat dan sebagainya [28]. Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi dalam dua kelompok yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis) seperti Butil Hidroksi Anisol (BHA), tokoferol, propil galat,

Butil Hidroksi Toluen (BHT) dan Tert-butil Hidroksi Quinon (TBHQ) [29] dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami) seperti senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin dan asam-asam organik polifungsional [30]. Selain flavonoid, senyawa antioksidan alami lainnya yaitu steroid, terpenoid, alkaloid dan antraquinon [31].

2.5 Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan berbagai metode. Beberapa metode uji aktivitas antioksidan adalah tiosianat, penentuan nilai peroksida, metode DPPH dan lain sebagainya. Metode DPPH merupakan metode yang cepat, sederhana dan tidak membutuhkan biaya mahal dalam menentukan aktivitas antioksidan menggunakan radikal bebas 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl (DPPH). Uji DPPH berdasarkan reduksi larutan metanol dari radikal bebas DPPH oleh penghambat radikal bebas. Prosedur pengujian melibatkan pengukuran penurunan absorbansi DPPH pada panjang gelombang maksimum 516 nm. Penurunan ini sebanding dengan konsentrasi penghambat radikal bebas yang ditambahkan pada larutan DPPH [32]. Besarnya aktivitas antioksidan dapat dinyatakan dengan nilai IC_{50} (The half maximal inhibition concentration) yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Masing-masing konsentrasi sampel dihitung nilai IC_{50} dengan menggunakan rumus persamaan regresi linier [33]. DPPH dapat digunakan untuk sampel yang berupa padatan maupun cairan [32].



Gambar 2.2 Reaksi DPPH dan antioksidan

Gugus kromofor dan auksokrom pada radikal bebas DPPH memberikan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 516 nm sehingga menimbulkan warna ungu. Warna DPPH akan berubah dari ungu menjadi kuning seiring bertambahnya antioksidan yaitu saat

elektron tunggal pada DPPH berpasangan dengan hidrogen dari antioksidan. Hasil dekolonisasi oleh antioksidan setara dengan jumlah elektron yang tertangkap. Mekanisme penangkapan radikal ditunjukkan pada **Gambar 2.2** [34,35].

2.6 *Ruellia tuberosa* L.

Tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa* Linn.) secara taksonomi mempunyai klasifikasi sebagai berikut [36]:

Kerajaan	: Plantae
Subkerajaan	: Tracheobionta
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Lamiales
Suku	: Acanthaceae
Marga	: Ruellia
Jenis	: <i>Ruellia tuberosa</i> L.



Gambar 2.3 Tanaman pletekan (*R. tuberosa*)

R. tuberosa merupakan tumbuhan *perennial* (tumbuhan yang hidup lebih dari dua tahun) dengan *quadrangular stem* (batang segi empat) berambut (**Gambar 2.3**). Daunnya merupakan daun sederhana berbentuk elips berlawanan dengan lebar sekitar 5 cm. Berbunga hanya pada awal musim hujan. Bunganya biseksual berwarna ungu. Dalam kapsulnya terdapat 7-8 biji yang akan terbuka saat mendapatkan kelembaban yang cukup dan biji hitam akan langsung terjatuh. Kapsul berbentuk baton dengan panjang 3 cm dan lama-lama berubah menjadi hitam. Tanaman ini memiliki jari-jari yang tebal

seperti akar dan tumbuh dengan baik pada daerah yang memiliki kondisi intensitas cahayanya rendah dan lembab [36].

Akar pletekan memiliki kandungan *hetriakontane*, *lupeol*, *sitosterol*, *stigmasterol*, *kampesterol*, *saponin*, *flavonoida*, dll. Saponin adalah kandungan dari akar pletekan yang paling banyak dimanfaatkan, salah satunya untuk mengobati infeksi saluran kemih. Akarnya yang kaya akan *flavonoid* dan *saponin* dapat dijadikan alternatif pengobatan sebagai penekan proses biokimia di dalam organisme, khususnya dalam proses infeksi oleh bakteri. Akar pletekan kaya akan *saponin* dan *flavonoida* yang berperan sebagai antioksidan yang efektif melawan beberapa penyakit degenerasi oksidatif. Beberapa manfaatnya seperti mengusir polusi dalam tubuh (radikal bebas), mencegah penuaan dini, menghindari tubuh dari penyakit mematikan, mencegah penyakit aterosklerosis, penolak alergi, mengusir virus, anti diare, baik untuk imun [36].

2.7 Fitosterol

Fitosterol dikenal sebagai sterol tumbuhan yang merupakan kelompok steroid, alkohol dan tidak ditemukan pada kelompok mamalia. Sesudah dipurifikasi, fitosterol tampak sebagai bubuk putih dengan bau yang khas. Senyawa ini tidak larut di dalam air tetapi larut di dalam alkohol. Senyawa ini banyak digunakan sebagai bahan tambahan pangan obat-obatan dan kosmetik. Fitosterol adalah sterol nabati dengan struktur mirip kolesterol tetapi fitosterol mengandung gugus etil ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) pada rantai cabang (**Gambar 2.4**). Fitosterol terdiri dari 28 hingga 30 atom dengan steroid sebagai rangka struktur dengan gugus hidroksil menempel pada C-3 dari cincin A dan rantai alifatik pada atom C-17 dari cincin D [37].

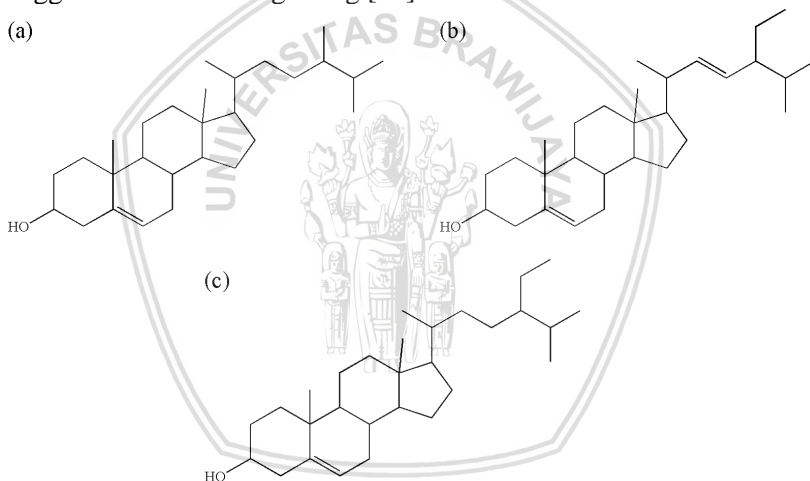
Secara umum sterol yang terdapat di dalam jaringan tanaman terdiri dari β -sitosterol, stigmasterol dan kampesterol dengan komposisi 70 % sitosterol, 20 % stigmasterol dan 5 % kampesterol. Jenis sterol lain seperti avenasterol dan brassika sterol juga terdapat dalam tanaman tetapi dalam jumlah kecil [38].

β -sitosterol merupakan fitosterol paling umum, sedangkan lainnya meliputi kampesterol, ergosterol, brassika sterol, delta-7-stigmasterol dan delta-7-avenasterol. β -sitosterol berbentuk seperti lilin, padatan jernih, berbau khas dan larut dalam pelarut organik tetapi tidak larut dalam air serta mengandung satu gugus fungsional alkohol.

Sitosterol diyakini memegang peranan penting dalam menurunkan kolesterol di dalam tubuh atau sebagai agen antikolesterolemik [39].

Stigmasterol merupakan asam lemak tak jenuh yang terdapat pada minyak tanaman seperti minyak kedelai, kacang kalabar, biji-bijian tua dan mentega coklat. Zat ini digunakan sebagai bahan pembuatan progesteronesintesis yaitu hormon sex perempuan yang memegang peranan fisiologis untuk mengatur dan mengalami perubahan kembali terhadap tubuh yang disebabkan oleh estrogen sebagaimana fase luteal saat siklus haid [39].

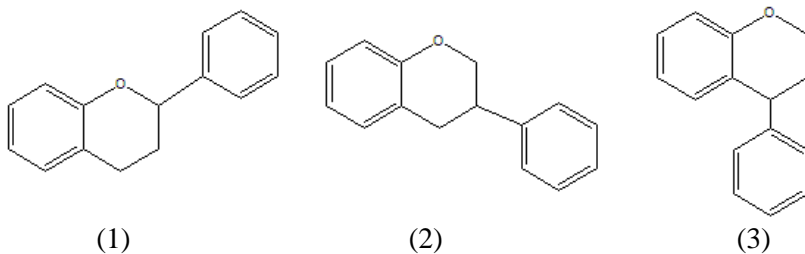
Campesterol terdapat dalam sayur-sayuran, buah-buahan dan kacang-kacangan. Konsentrasi antara 1-7 mg ditemukan dalam buah pisang, kopi, timun, oat, anggur dan kentang. Minyak goreng seperti minyak jagung dan canola mengandung konsentrasi yang jauh lebih tinggi antara 16-100 mg/100 g [39].



Gambar 2.4 Struktur umum (a) campesterol, (b) stigmasterol dan (c) β -sitosterol

2.8 Flavonoid

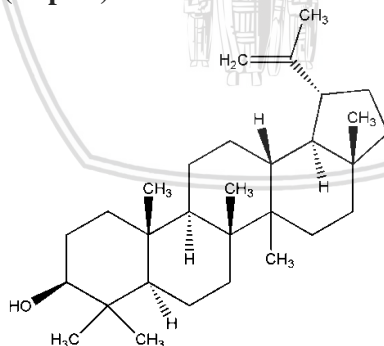
Flavonoid merupakan senyawa bahan alam yang mengandung dua cincin aromatik benzena yang dihubungkan oleh 3 atom karbon, atau suatu fenilbenzopiran ($C_6-C_3-C_6$). Bergantung pada posisi ikatan dari cincin aromatik benzena pada rantai penghubung tersebut, kelompok flavonoid dibagi menjadi 3 kelas utama, flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid (**Gambar 2.5**) [40].



Gambar 2.5 Struktur umum (1) flavonoid, (2) isoflavonoid dan (3) neoflavonoid

Tumbuhan yang mengandung flavonoid banyak dipakai dalam pengobatan tradisional. Hal tersebut disebabkan karena flavonoid mempunyai berbagai macam aktivitas terhadap macam-macam organisme [41]. Penelitian farmakologi terhadap senyawa flavonoid menunjukkan bahwa beberapa senyawa golongan flavonoid memperlihatkan aktivitas seperti antifungi, diuretik, antihistamin, antihipertensi, insektisida, bakterisida, antivirus dan menghambat kerja enzim [42]. Selain itu, senyawa flavonoid memiliki aktivitas antioksidan yang cukup tinggi [43].

2.9 Triterpenoid (Lupeol)



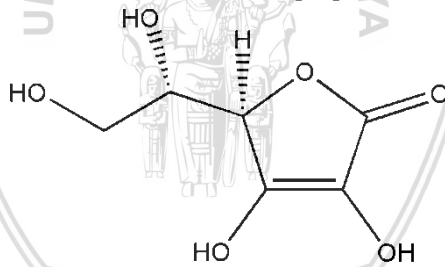
Gambar 2.6 Struktur umum lupeol

Lupeol adalah turunan triterpenoid yang memiliki rumus kimia C₃₀H₅₀O (**Gambar 2.6**), titik leleh sebesar 215-216 °C dan berat molekul sebesar 426.7 g/mol [45]. Lupeol larut dalam etanol, aseton dan kloroform serta memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi,

antioksidan [44], melawan peradangan, kanker, artritis, diabetes, penyakit jantung, toksisitas ginjal dan hati [45]. Spektrum inframerah (IR) lupeol menunjukkan adanya gugus fungsi hidroksil oleh olefin pada spektrum masing-masing yaitu 3235 dan 1640 cm^{-1} . Dengan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC), spektrofotometri UV dan spektrofotometri massa (MS), lupeol memberikan puncak ion pada m/z 409 [44].

2.10 Vitamin C

Vitamin C tersebar luas di alam, sebagian besar terdapat dalam tumbuhan seperti buah, sayur hijau, tomat, kentang dan sebagainya [46]. Vitamin C atau L-asam askorbat merupakan senyawa berbentuk padatan kristal putih dengan berat molekul 176,13 g/mol, rumus molekul $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (**Gambar 2.7**) dan mudah larut dalam air. Dalam keadaan kering vitamin C cukup stabil, tetapi dalam keadaan larut vitamin C mudah rusak karena bersentuhan dengan udara (oksigen) terutama bila terkena sinar matahari. Oksidasi dipercepat dengan adanya tembaga dan besi. Vitamin C tidak stabil dalam larutan alkali, namun cukup stabil dalam larutan asam [47].



Gambar 2.7 Struktur vitamin C

2.11 Tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) secara taksonomi mempunyai klasifikasi sebagai berikut [48]:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae

Genus : *Rattus*
Spesies : *Rattus norvegicus*
Galur : *Wistar*



Gambar 2.8 Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Ciri-ciri dari hewan ini yaitu memiliki rambut/bulu berwarna putih, hidung tumpul, panjang tubuh sekitar 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm (**Gambar 2.8**). *Rattus norvegicus* memiliki mata berwarna merah dengan panjang ekor sekitar 205 mm dan memiliki berat badan yang berkisar 100-150 g pada usia dewasa. Hewan ini memiliki waktu hidup 2,5-3,5 tahun dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari [48].

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan sebagai hewan coba karena mempunyai respon yang cepat serta dapat memberikan gambaran secara ilmiah yang mungkin terjadi pada manusia maupun hewan lain. Dalam kode etik penelitian kesehatan dicantumkan bahwa salah satu prinsip dasar riset biomedis dimana manusia sebagai subjek harus memenuhi prinsip ilmiah yang telah diakui dan harus didasarkan atas eksperimen laboratorium dan hewan percobaan yang memadai serta berdasarkan pengetahuan yang lengkap dari literatur ilmiah [48]. Temperatur 19 °C hingga 23 °C dengan kelembaban 40-70 % merupakan temperatur yang cocok untuk habitat tikus yang juga tergolong dalam hewan nokturnal [49].

Wolfenshon and Lloyd [49] menyatakan bahwa berat tikus jantan dewasa yaitu 450-520 g sedangkan berat 250-300 g berlaku pada tikus betina. Tikus jantan lebih berat dibanding tikus betina pada semua kelompok umur karena terjadinya perubahan bobot organ

(ginjal, hati, paru dan limpa), nilai hematologi, nilai biokimia darah (AST dan ALT) seiring dengan bertambahnya umur tikus [50].

Kebutuhan makan dan minum tikus putih berkisar 5 hingga 10 g per 100 g berat badan dan 10 mL per 100 g berat badan serta jangka hidup 3 sampai 4 tahun. Pakan yang diberikan pada tikus umumnya tersusun dari komposisi alami dan mudah diperoleh dari sumber daya komersial. Namun demikian, pakan yang diberikan pada tikus sebaiknya mengandung nutrisi dalam komposisi yang tepat. Pakan ideal untuk tikus yang sedang tumbuh harus memenuhi kebutuhan zat makanan antara lain protein 12 %, lemak 5 %, dan serat kasar kira-kira 5 %, harus cukup mengandung vitamin A, vitamin D, asam linoleat, tiamin, riboflavin, pantotenat, vitamin B12, biotin, piridoksin dan kolin serta mineral-mineral tertentu. Pakan yang diberikan pada tikus harus mengandung asam amino esensial seperti Arginin, Isoleusin, Leusin, Methionin, Fenilalanin, Treonin, Tryptofan, dan Valine [49].

Selain pakan, hal yang perlu diperhatikan dalam penggunaan tikus putih sebagai hewan percobaan adalah perkandangan yang baik. Kandang tikus terbuat dari kotak plastik yang ditutup dengan kawat berlubang ukuran 1,6 cm². Kulit biji padi dapat digunakan sebagai alas kandang tikus. Alas kandang diganti setiap 3 hari bertujuan agar kebersihan tikus tetap terjaga dan tidak terkontaminasi bakteri yang ada di feses serta urine tikus [50].

2.12 Pankreas

Pankreas terletak pada rongga abdomen, memiliki permukaan yang membentuk lobulasi, berwarna putih keabuan hingga kemerahan [51]. Organ ini merupakan kelenjar majemuk yang terdiri atas jaringan eksokrin yang menghasilkan enzim–enzim pankreas (amilase, peptidase dan lipase) dan jaringan endokrin yang menghasilkan hormon–hormon (insulin, glukagon dan somatostatin) [52].

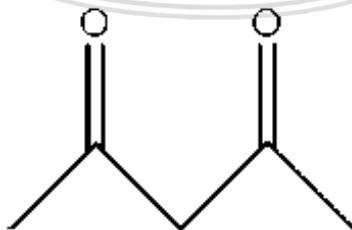
Fungsi endokrin pankreas terdapat pada sekelompok sel yang ditemukan oleh Langerhans di tahun 1869, sehingga sekelompok sel tersebut dinamakan sebagai pulau Langerhans. Pada tikus dewasa, pankreas berisi kira-kira 1-2 % pulau-pulau Langerhans dengan diameter antara 100-200 µm [52]. Ada lima tipe sel yang ditemukan di pulau Langerhans tikus, masing-masing memiliki kemampuan sekresi hormon yang berbeda-beda yaitu [53]:

1. Sel alpha, yaitu sel yang menghasilkan hormon glukagon. Sel ini merupakan sel terbanyak kedua yang ditemukan di pulau Langerhans setelah sel beta (20 %)
2. Sel beta, yaitu sel yang menghasilkan hormon insulin. Sel β terletak di dalam pulau Langerhans dan memenuhi sekitar 80 % dari volume pulau Langerhans.
3. Sel delta, sel ini menghasilkan somatostatin
4. Sel F, sel ini menghasilkan *pancreatic polypeptide* yang belum diketahui jelas fungsinya
5. Sel Gamma

Pada penderita diabetes melitus tipe I ditemukan perubahan-perubahan pada pankreas berupa pengecilan ukuran dari pankreas, atrofi pada bagian eksokrin pankreas, dan atrofi sel-sel asinar di sekitar pulau Langerhans yang mengalami degenerasi. Sedangkan pada diabetes melitus tipe II yang terjadi adalah ketidakseimbangan dari sekresi eksokrin pankreas dan gangguan kontrol glukosa darah [53].

2.13 Malondialdehid (MDA)

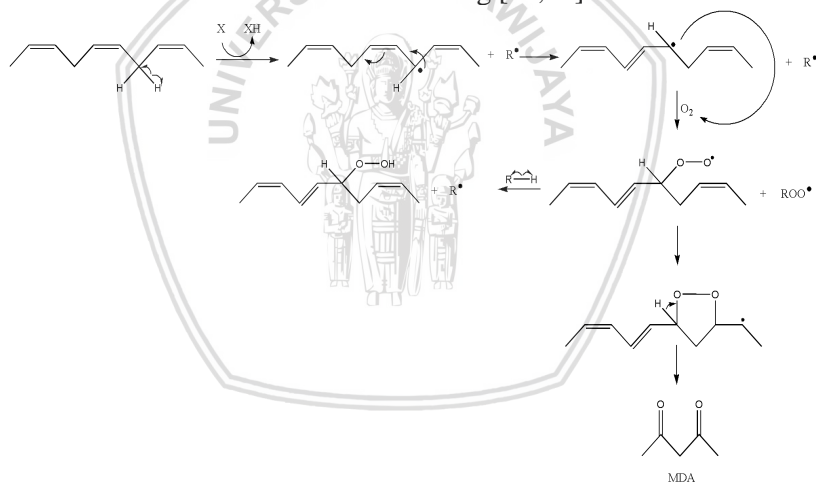
MDA adalah senyawa dialdehida yang merupakan produk akhir peroksidasi lipid di dalam tubuh. Senyawa ini memiliki tiga rantai karbon dengan rumus molekul $C_3H_4O_2$ (**Gambar 2.9**). MDA merupakan produk dekomposisi dari asam amino, karbohidrat kompleks, pentosa dan heksosa. Selain itu, MDA juga merupakan produk yang dihasilkan oleh radikal bebas melalui reaksi ionisasi dalam tubuh dan produk samping biosintesis prostaglandin yang merupakan produk akhir oksidasi lipid membran [54].



Gambar 2.9 Struktur malondialdehid (MDA)

Menurut Conti, et al [55], MDA merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh oleh radikal bebas. Di samping itu, MDA juga merupakan metabolit komponen sel yang dihasilkan oleh radikal bebas. Oleh sebab itu, konsentrasi MDA yang tinggi menunjukkan adanya proses oksidasi dalam membran sel. Status antioksidan yang tinggi biasanya diikuti oleh penurunan kadar MDA [56].

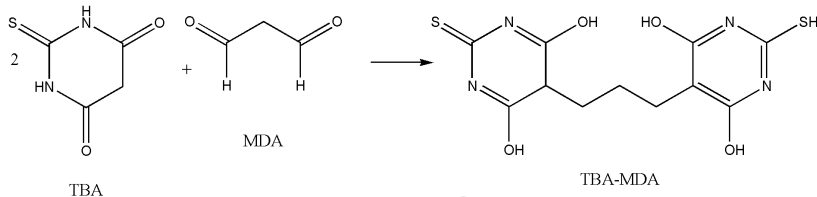
MDA dapat bereaksi dengan komponen nukleofilik atau elektrofilik. Aktivitas non-spesifiknya, MDA dapat berikatan dengan berbagai molekul biologis seperti protein, asam nukleat dan amino fosfolipid secara kovalen. MDA dapat menghasilkan polimer dalam berbagai berat molekul dan polaritas [57]. Efek negatif senyawa radikal maupun metabolit elektrofil ini dapat diredam oleh antioksidan, baik yang berupa zat gizi seperti vitamin A, C, E dan albumin ataupun antioksidan non-gizi seperti flavonoid dan gingerol. Oleh karena itu, tinggi rendahnya kadar MDA sangat bergantung pada status antioksidan dalam tubuh seseorang [57,58].



Gambar 2.10 Mekanisme pembentukan MDA

Peningkatan kadar MDA menunjukkan kerusakan sel β pankreas yang terkait dengan diabetes melitus tipe 1. Hal tersebut ditunjukkan oleh jumlah radikal OH^\bullet yang meningkat. Radikal OH^\bullet ini akan membentuk reaksi rantai melalui donor 1 atom hidrogen dari membran sel sehingga akan terjadi reaksi peroksidasi lipid (**Gambar 2.10**) sehingga fungsi dari membran sel dapat terganggu [59].

Metode pengukuran kadar MDA (Malondialdehida) ini menggunakan metode *thiobarbituric acid* atau biasa dikenal dengan TBA. Reaksi antara TBA dengan MDA (**Gambar 2.11**) ini melibatkan C5 dari TBA dan C1 dari MDA yang membentuk serangkaian nukleofilik [60].



Gambar 2.11 Reaksi antara TBA dengan MDA

2.14 Hipotesis Penelitian

1. Ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) aktif sebagai antioksidan
2. Pemberian ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) sebagai terapi DMT 1 dapat menurunkan kadar MDA pada pankreas tikus putih (*Rattus norvegicus*) hasil induksi MLD-STZ

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai Juni 2018 di laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas (cawan petri, labu ukur, gelas ukur, batang pengaduk, gelas arloji, gelas kimia, corong gelas, erlenmeyer, pipet ukur 5 dan 10 mL, pipet tetes), bejana maserasi, neraca analitik, dongkrak hidrolik, penangas air, termometer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, sentrifugasi, vortex, lemari pendingin, *glucometer* (GCU), glukostick, *microtube*, kandang tikus, botol minum tikus, sekam, spuid, sarung tangan, masker, pH meter, *waterbath*, seperangkat alat *rotary evaporator*, gunting, spatula, *petri dish*, *magnetic stirrer*, *hotplate*, tabung sentrifuge, mortar, kamera digital, kuvet, *blood lancet*, nampan bedah, *yellow* dan *blue micro tip*, tabung Eppendorf, bola hisap, kertas saring, kapas, aluminium foil, *cooler box*, botol sampel, botol *vial*, *micropipet*, spektrofotometer UV-Vis dan oven.

3.3 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain serbuk akar pletekan (*R. tuberosa*) yang diperoleh dari Materia Medika Batu, tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar usia 2 bulan dengan berat berkisar 150-200 g sebanyak 20 ekor, MLD-STZ dengan dosis 20 mg/kg BB, sampel pankreas tikus putih (*Rattus norvegicus*), pakan tikus, NaCl fisiologis 0,9 %, etanol 96 %, aquades, padatan asam sitrat, larutan asam sitrat 0,2 M, padatan natrium sitrat dihidrat, larutan natrium sitrat 0,2 M, padatan STZ, alkohol 70 %, asam trikloroasetat (TCA) 10 %, HCl 1 N, metanol, Na-thiobarbiturat 1%, 1,1-*diphenyl-2-picrylhy-drazyl* (DPPH), padatan vitamin C, larutan buffer sitrat pH 4,5.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan dalam beberapa tahapan, yaitu:

1. Pembuatan ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*)
2. Pembuatan larutan ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) 90 µg/mL
3. Pembuatan larutan pembanding vitamin C standar 100 µg/mL
4. Pembuatan larutan DPPH (1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl) 20 µg/mL
5. Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol akar pletekan dan vitamin C
6. Preparasi hewan coba dan penentuan kadar glukosa darah tikus sebelum terapi ekstrak etanol akar pletekan
7. Preparasi larutan buffer sitrat 0,2 M dengan pH 4,5
8. Pembuatan larutan MLD-STZ
9. Induksi hewan coba dengan MLD-STZ selama 5 hari berturut-turut
10. Terapi ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) dengan dosis 250 mg/kg BB, 375 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB selama 21 hari
11. Pengujian kadar glukosa darah hewan coba setelah diterapi ekstrak akar pletekan
12. Pengambilan pankreas hewan coba
13. Pengujian kadar malondialdehid (MDA) pada pankreas hewan coba
14. Analisis data

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) dan penentuan dosis terapi

Akar pletekan (*R. tuberosa*) dicuci hingga bersih, dikeringkan, dan dipotong kecil-kecil. Akar pletekan (*R. tuberosa*) yang telah kering dihaluskan hingga menjadi serbuk halus. Serbuk akar pletekan (*R. tuberosa*) ditimbang sebanyak 900 g dan dimaserasi. Digunakan 1,5 L pelarut etanol absolut:aquades (1:1) sehingga serbuk terendam dengan pelarut. Maserasi dilakukan selama 3x24 jam. Ekstrak cair dipisahkan dari endapannya disaring dengan kertas saring hingga diperoleh filtrat yang terbebas dari endapan. Filtrat diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator pada temperatur 55-60 °C, 120 rpm

hingga diperoleh ekstrak kental. Dosis terapi yang digunakan adalah 250 mg/kg BB, 375 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB.

3.5.2 Pembuatan larutan stok ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*)

Ekstrak etanol akar pletekan ditimbang sebanyak 0,01 g menggunakan neraca analitik. Dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL dan ditambah dengan etanol 96 % secukupnya hingga larut. Larutan dipindahkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambah etanol 96 % hingga tanda batas. Labu ukur ditutup dan larutan dikocok hingga homogen. Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL dan 10 µg/mL.

3.5.3 Pembuatan larutan stok vitamin C standar

Padatan vitamin C ditimbang sebanyak 0,01 g menggunakan neraca analitik. Dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL dan ditambah dengan aquades secukupnya hingga larut. Larutan dipindahkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambah aquades hingga tanda batas. Labu ukur ditutup dan larutan dikocok hingga homogen. Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL dan 10 µg/mL.

3.5.4 Pembuatan larutan DPPH (1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Padatan DPPH ditimbang sebanyak 0,001 g menggunakan neraca analitik. Dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL dan ditambah dengan metanol secukupnya hingga larut. Larutan dipindahkan kedalam labu ukur 50 mL dan ditambah metanol hingga tanda batas. Labu ukur ditutup dan larutan dikocok hingga homogen. Selanjutnya dibuat konsentrasi 20 µg/mL.

3.5.5 Pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH

Pengujian dilakukan dengan cara larutan DPPH konsentrasi 20 µg/mL dipipet sebanyak 10 mL. Kemudian didiamkan pada temperatur 37°C pada ruangan gelap (terlindung dari sinar matahari). Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-800 nm.

3.5.6 Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol akar

Pletekan (*R. tuberosa*)

Pengujian dilakukan dengan cara dipipet 6 mL larutan sampel ekstrak etanol akar pletekan dari berbagai konsentrasi 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL dan 10 µg/mL. Kemudian masing-masing ditambahkan 4 mL larutan radikal bebas DPPH 20 µg/mL, divortex dan diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 20 menit diukur absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm.

Aktivitas penangkal radikal bebas diekspresikan sebagai persen aktivitas yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut [61]:

$$\text{aktivitas antioksidan(\%)} = \left(\frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \right) \times 100$$

Konsentrasi sampel dan persen aktivitas antioksidannya di plot masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} dari masing-masing sampel dinyatakan dengan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai IC_{50} [62].

3.5.7 Pengukuran aktivitas antioksidan larutan pembanding

vitamin C standar

Pengujian dilakukan dengan cara dipipet 6 mL larutan sampel vitamin C standar dari berbagai konsentrasi 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL dan 10 µg/mL. Kemudian masing-masing ditambahkan 4 mL larutan radikal bebas DPPH 20 µg/mL, divortex dan diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 20 menit diukur absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm.

3.5.8 Preparasi hewan coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *wistar* jantan yang diperoleh dari Biosains Universitas Brawijaya. Tikus berusia ± 2 bulan dengan berat badan ± 200 g. Digunakan 20 ekor tikus yang dibagi dalam 5 kelompok sebagai berikut:

- 1) Kelompok 1 (4 ekor) sebagai hewan kontrol yang tidak diinduksi dengan MLD-STZ dan tanpa terapi ekstrak akar pletekan (*R. tuberosa*)

- 2) Kelompok 2 (4 ekor) sebagai kontrol positif, tikus diinduksi dengan MLD-STZ namun tidak diberi terapi ekstrak akar pletekan (*R. tuberosa*)
- 3) Kelompok 3 (4 ekor) sebagai kontrol negatif, tikus diinduksi dengan MLD-STZ kemudian diberi terapi ekstrak akar pletekan (*R. tuberosa*) dengan dosis 250 mg/kg BB.
- 4) Kelompok 4 (4 ekor) sebagai kontrol negatif, tikus diinduksi dengan MLD-STZ kemudian diberi terapi ekstrak akar pletekan (*R. tuberosa*) dengan dosis 375 mg/kg BB.
- 5) Kelompok 5 (4 ekor) sebagai kontrol negatif, tikus diinduksi dengan MLD-STZ kemudian diberi terapi ekstrak akar pletekan (*R. tuberosa*) dengan dosis 500 mg/kg BB.

Tikus ditempatkan pada kandang dan diaklimatisasi selama 7 hari.

3.5.9 Pengukuran kadar glukosa darah pada hewan coba

Kadar glukosa darah tikus diukur pada saat sebelum diinduksi MLD-STZ sehingga diketahui kadar glukosa awal sebelum terkena diabetes melitus. Dilakukan pula pengukuran setelah diinjeksi MLD-STZ, dimana tikus dikatakan positif diabetes melitus apabila kadar glukosa darah lebih dari 200 mg/dL. Setelah pemberian ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*), dilakukan pengukuran kadar glukosa darah. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan glukometer digital. Mula-mula ujung ekor tikus diusapkan alkohol 75%, kemudian ditusuk dengan *blood lancet*. Darah yang keluar diteteskan pada ujung *blood strip* yang berhubungan dengan glukometer dan dibaca kadar glukosa darah tikus.

3.5.10 Pembuatan larutan natrium sitrat 0,2 M sebanyak 100 mL

Padatan natrium sitrat $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ditimbang sebanyak 5,88 g menggunakan neraca analitik. Dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL dan ditambah dengan aquades secukupnya hingga natrium sitrat larut. Larutan dipindahkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambah aquades hingga tanda batas. Labu ukur ditutup dan larutan dikocok hingga homogen.

3.5.11 Pembuatan larutan asam sitrat 0,2 M sebanyak 100 mL

Padatan asam sitrat $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ditimbang sebanyak 4,2 g menggunakan neraca analitik. Dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL dan ditambah dengan aquades secukupnya hingga padatan larut. Larutan dipindahkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambah aquades hingga tanda batas. Labu ukur ditutup dan larutan dikocok hingga homogen.

3.5.12 Pembuatan buffer sitrat 0,2 M dengan pH 4,5

Larutan asam sitrat 0,2 M diambil sebanyak 27,5 mL dan larutan natrium sitrat sebanyak 22,5 mL dengan menggunakan pipet volume dan dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL. Larutan dihomogenkan dengan bantuan *magnetic stirrer*. Diukur pH nya dengan menggunakan pH meter yang telah dikondisikan sebelumnya, ditetesi dengan natrium sitrat apabila pH masih terlalu asam. Namun apabila pH terlalu basa, maka ditetesi dengan asam sitrat hingga pH 4,5.

3.5.13 Pembuatan dan injeksi MLD-STZ

STZ yang berupa padatan ditimbang seberat 325,9 mg dengan neraca analitik, kemudian dimasukkan kedalam tabung *falcon* 1,5 mL. Ditambahkan dengan 1003,35 μ L buffer sitrat 0,2 M dengan pH 4,5 kedalam tabung *falcon* 1,5 mL berisi padatan STZ. Larutan divortex hingga homogen dan disimpan pada temperatur 4 °C.

Setelah 1 minggu, tikus dengan kelompok yang telah dibagi diberikan perlakuan sakit dengan diinduksi dengan MLD-STZ. Sebelum diinduksi dengan MLD-STZ, tikus diukur berat badannya. Volume yang digunakan untuk injeksi disesuaikan dengan berat badan tikus. Dosis yang digunakan yakni 20 mg/kg BB yang diinjeksikan secara intraperitoneal selama 5 hari berturut-turut. Tikus diposisikan menghadap ke arah frontal sehingga terlihat abdomennya. Pada bagian atas abdomen diusapkan dengan alkohol 75%, kemudian kulit dicubit hingga terasa bagian ototnya. Selanjutnya ditusukkan jarum suntik dan dimasukkan STZ secara perlahan serta abdomen tikus diusapkan kembali dengan alkohol 75 %. Tikus yang telah diinjeksi STZ diinkubasi selama 7 hari. Tikus dikatakan positif DM apabila glukosa darah melebihi 200 mg/dL.

3.5.14 Terapi ekstrak etanol akar tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa* L.)

Ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) yang berupa ekstrak kental dilarutkan dalam aquades sebanyak 3 mL. Campuran ini digunakan sebagai terapi pada hewan coba tikus. Dosis terapi ekstrak etanol akar pletekan ini sebanyak 250 mg/kg BB, 375 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB pada masing-masing kelompok dan diberikan secara sonde lambung (oral). Massa ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) yang digunakan untuk terapi disesuaikan dengan berat badan tikus.

3.5.15 Pembedahan dan pengambilan pankreas tikus

Mula-mula tikus diletakkan diatas nampan bedah dan ditata pada posisi ventral diatas, lalu dilakukan dislokasi leher. Kemudian tikus dibedah dan diambil organ-organ serta darahnya dengan bantuan skalpel dan alat bedah lain. Organ yang telah diambil dicuci dengan larutan NaCl fisiologis 0.9 % dan disimpan dalam larutan PBS azida pada temperatur 4 °C

3.5.16 Pembuatan kurva standar malondialdehid (MDA)

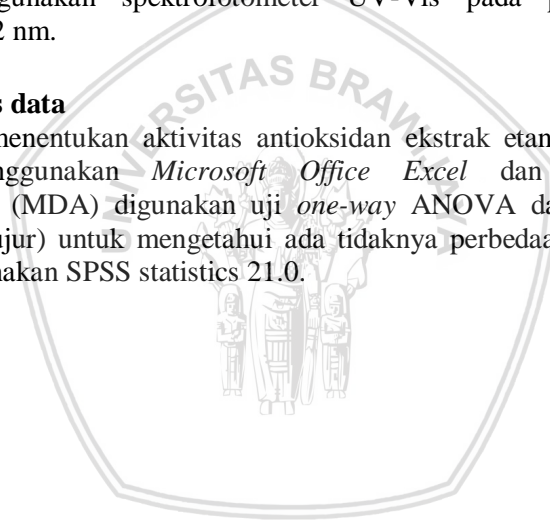
Dibuat larutan standar MDA dengan variasi konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 µg/mL masing-masing diambil sebanyak 100 µL, kemudian dimasukkan dalam tabung *eppendorf* yang berbeda. Ditambahkan dengan 550 µL aquades pada masing-masing tabung *eppendorf*. Larutan standar ditambahkan 100 µL TCA 10 %, 250 µL HCl 1 N, dan 100 µL Na-Thio 1 %. Campuran dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Tabung *eppendorf* ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi dalam penangas air pada temperatur 100 °C selama 30 menit. Larutan didinginkan pada temperatur 26-27 °C, selanjutnya larutan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit agar diperoleh supernatan. Diukur absorbansi supernatan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 532 nm sehingga diperoleh absorbansi dari larutan standar berbagai konsentrasi tersebut. Selanjutnya dibuat kurva standar MDA yang terdiri dari hubungan antara absorbansi (y) dengan konsentrasi (x).

3.5.17 Pengukuran kadar malondialdehid (MDA)

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode TBA (*Thiobarbituric Acid*). Supernatan diambil sebanyak 100 μL dan dimasukkan ke dalam tabung *microtube*, lalu ditutup dengan aluminium foil. Ditambahkan 550 μL aquades dan dihomogenkan. Ditambahkan 100 μL TCA 10 % dan dihomogenkan dengan vortex. Selanjutnya ditambahkan 250 μL HCl 1 N dan 100 μL *sodium barbituric acid* (Na-thio 1%). Campuran dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Dipanaskan dalam *water bath* pada temperatur 100 $^{\circ}\text{C}$ selama 20 menit. Selanjutnya larutan didinginkan dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Kemudian filtrat dipindahkan ke dalam tabung *microtube* yang baru. Diukur absorbansi sampel menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 532 nm.

3.5.18 Analisis data

Untuk menentukan aktivitas antioksidan ekstrak etanol akar pletekan menggunakan *Microsoft Office Excel* dan kadar malondaldehyd (MDA) digunakan uji *one-way ANOVA* dan BNJ (Beda nyata jujur) untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang nyata menggunakan SPSS statistics 21.0.



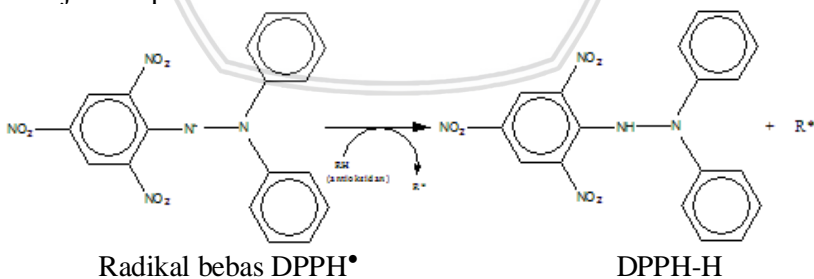
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Akar Pletekan (*R. tuberosa*)

Ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk akar pletekan sebanyak 900 g dalam pelarut aquades:etanol (1:1) berupa ekstrak kental berwarna coklat kehitaman sebanyak 284,4 g dengan persentase yield sebesar 31,60 %. Kadar air dan kadar abu dalam ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) yaitu sebesar 10 % dan 10,54 %

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metode serapan radikal bebas DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), metode ini digunakan karena merupakan metode yang sederhana, mudah dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat. Metode peredaman radikal bebas DPPH didasarkan pada reduksi dari radikal bebas DPPH yang berwarna oleh penghambat radikal bebas. Metode ini melibatkan pengukuran penurunan serapan DPPH pada panjang gelombang maksimalnya, yang sebanding terhadap konsentrasi penghambat radikal bebas yang ditambahkan ke larutan reagen DPPH.

Gugus kromofor dan auksokrom pada radikal bebas DPPH memberikan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 516 nm sehingga menimbulkan warna ungu. Mekanisme penangkapan radikal ditunjukkan pada **Gambar 4.1** :



Gambar 4.1 Reaksi antara DPPH dengan antioksidan [35]

Uji aktivitas antioksidan dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Hasil uji aktivitas antioksidan secara kualitatif, ekstrak etanol akar pletekan dan vitamin C menunjukkan dari konsentrasi

sampel 2 $\mu\text{g/mL}$ hingga konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ memiliki daya peredaman radikal bebas yang cukup baik ditandai dengan adanya perubahan warna kuning setelah ditambahkan DPPH yang awalnya berwarna ungu. Warna kuning ini timbul karena elektron tidak berpasangan pada molekul DPPH telah berikatan dengan antioksidan dari ekstrak etanol akar pletekan dan vitamin C sehingga terjadi perubahan warna ungu menjadi kuning (**Lampiran F**). Warna DPPH akan berubah dari ungu menjadi kuning seiring bertambahnya antioksidan yaitu saat elektron tunggal pada DPPH berpasangan dengan hidrogen dari antioksidan [34,35].

Uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran absorbansi ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) dan vitamin C dilakukan pada konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 $\mu\text{g/mL}$ dengan tiga kali pengulangan (**Lampiran H**). Hasil uji dilaporkan sebagai IC_{50} (The half maximal inhibition concentration) yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50 % radikal bebas DPPH. Masing-masing konsentrasi sampel dihitung nilai IC_{50} dengan menggunakan rumus persamaan regresi linier [33].

Tabel 4.1 Nilai IC_{50} (inhibitory concentration) ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) dan vitamin C

Konsentrasi sampel ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas antioksidan (%)		IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	Ekstrak	Vitamin C	Ekstrak	Vitamin C
2	49,62	48,86		
4	50,76	50,38		
6	52,27	53,41	2,484 \pm	3,184 \pm
8	53,03	56,25	1,748	3,770
10	53,98	57,77		

Berdasarkan **Tabel 4.1**, hasil uji aktivitas antioksidan dengan DPPH terhadap ekstrak etanol akar pletekan menunjukkan nilai absorbansi yang menurun seiring dengan naiknya konsentrasi sampel dan persentase aktivitas antioksidan. Ekstrak etanol akar pletekan memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} 2,484 $\mu\text{g/mL}$ yang

menunjukkan bahwa ekstrak etanol akar pletekan memiliki nilai IC_{50} dibawah 50 $\mu\text{g/mL}$ sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol akar pletekan memiliki potensi antioksidan yang sangat kuat. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai $IC_{50} < 50$ $\mu\text{g/mL}$, kuat untuk nilai IC_{50} 50-100 $\mu\text{g/mL}$, sedang jika IC_{50} bernilai 100-150 $\mu\text{g/mL}$, lemah jika IC_{50} bernilai 150-200 $\mu\text{g/mL}$ dan sangat lemah jika nilai $IC_{50} > 200$ $\mu\text{g/mL}$ [43].

Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol akar pletekan dibandingkan dengan vitamin C murni, aktivitas antioksidan ekstrak etanol akar pletekan lebih kuat dibanding vitamin C. Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol akar pletekan diperoleh nilai IC_{50} 2,484 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan vitamin C sebesar 3,184 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} pada ekstrak etanol akar pletekan lebih rendah dibanding vitamin C sebagai pembanding karena kandungan pada ekstrak etanol akar pletekan lebih banyak dibanding vitamin C.

Berdasarkan uji LCMS ekstrak etanol akar pletekan (**Lampiran D**), mengandung senyawa fitosterol (β -sitosterol, stigmasterol dan kampesterol) sedangkan uji fitokimia (**Lampiran D**) mengandung senyawa flavonoid, triterpenoid (lupeol), fenolik, vitamin C sehingga senyawa yang berperan dalam antioksidan pada ekstrak etanol akar pletekan lebih banyak dibanding vitamin C. Rendahnya nilai IC_{50} pada vitamin C disebabkan karena penyimpanan sampel yang kurang baik yaitu dibiarkan lama di ruang terbuka. Dalam keadaan kering vitamin C cukup stabil, namun dalam keadaan larutan vitamin C mudah rusak karena bersentuhan dengan udara (oksigen) terutama bila terkena sinar matahari [47].

4.2 Profil Malondialdehid (MDA) pada Pankreas Tikus Hasil

Induksi MLD-SIZ dan Terapi Ekstrak Etanol Akar Pletekan

(*R. tuberosa*)

Pembuatan hewan model tikus DM Tipe 1 dilakukan dengan cara injeksi streptozotocin dosis rendah berulang (MLD-STZ) secara intraperitorial (*i.p*) dengan dosis 20 mg/kg BB/hari selama 5 hari berturut-turut. Pemberian streptozotocin menyebabkan tikus menderita diabetes melitus dengan ditandai adanya kerusakan pada sel β pankreas dan kadar glukosa darah tikus meningkat.

Pemberian terapi ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) dapat dilihat dari perubahan kadar malondialdehid (MDA) yang

terjadi pada organ pankreas tikus diabetes melitus tipe 1. Pengujian kadar malondialdehid dilakukan dengan reagen *thiobarbyturic acid* (TBA) menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 532 nm.

Tabel 4.2 Rata-rata kadar MDA pankreas tikus

Perlakuan	Rata-rata kadar MDA ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar MDA (%)	
		Peningkatan terhadap kontrol negatif	Penurunan terhadap kontrol positif
Kontrol Negatif	1,263 \pm 0,136 ^a	-	-
Kontrol Positif	4,137 \pm 0,145 ^e	227,63	-
Terapi 250 mg/kg BB	2,046 \pm 0,181 ^b	-	50,55
Terapi 375 mg/kg BB	2,502 \pm 0,132 ^c	-	39,53
Terapi 500 mg/kg BB	3,006 \pm 0,150 ^d	-	27,34

Hasil analisa statistik SPSS 21.0 (**Lampiran O**) menunjukkan bahwa kadar malondialdehid (MDA) antar kelompok perlakuan memiliki varian yang sama atau homogen dan terdistribusi secara normal ($p>0,05$). Hasil uji *one-way* ANOVA menunjukkan adanya perbedaan kadar malondialdehid (MDA) secara signifikan ($p<0,01$) antar kelompok perlakuan, ditunjukkan dengan nilai F_{hitung} (206,685) $> F_{\text{tabel}}$ 1 % (4,89). Hasil perhitungan statistik *Tukey test*, menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata antar kelompok perlakuan, ditunjukkan dengan notasi yang berbeda (**Tabel 4.2**).

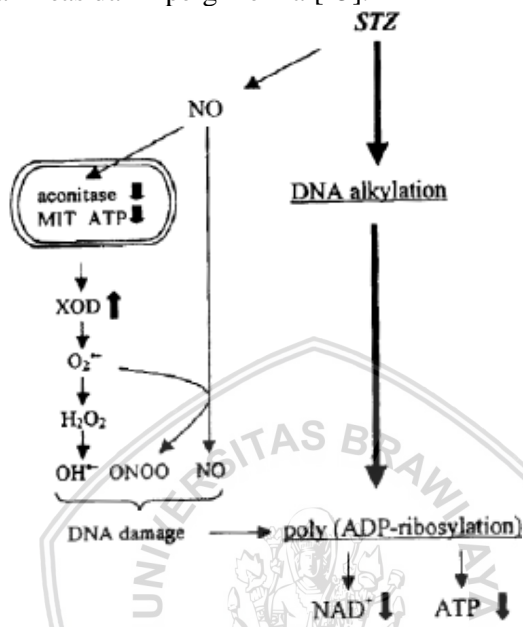
Berdasarkan **Tabel 4.2**, Nilai rata-rata kadar MDA pada kelompok normal adalah 1,263 \pm 0,136 $\mu\text{g/mL}$. Nilai tersebut menunjukkan standar nilai rata-rata kadar MDA pada tikus dalam keadaan normal. Kadar MDA pada kelompok normal merupakan hasil dari adanya ketidakseimbangan antara produksi ROS dan antioksidan dalam tubuh, fagositosis sel yang rusak atau metabolisme normal. Jumlah radikal bebas pada kelompok normal tidak melebihi jumlah antioksidan dalam tubuh sehingga antioksidan mampu meredam

radikal bebas dan menghambat terjadinya peroksidasi lipid. Nilai rata-rata kadar MDA kelompok tikus diabetes menunjukkan nilai paling tinggi yaitu $4,137 \pm 0,145 \mu\text{g/mL}$. Kenaikan rata-rata kadar MDA pada kelompok kontrol positif sebesar 227,63% yang disebabkan oleh aktivitas STZ yang terakumulasi pada pankreas tikus. Paparan MLD-STZ dapat menyebabkan terjadinya peningkatan radikal bebas pada pankreas tikus sehingga memicu stres oksidatif yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid pada membran sel yang disebabkan oleh reaksi antara radikal bebas dengan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) akan menghasilkan malondialdehid (MDA) yang bersifat toksik terhadap sel [63].

Induksi streptozotocin pada kelompok kontrol positif menyebabkan tikus mengalami kerusakan sel β pankreas karena peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan menyebabkan kenaikan kadar MDA pada pankreas tikus. Hasil induksi STZ menyebabkan tikus mengalami hiperglikemia. Struktur STZ sangat mirip dengan molekul glukosa sehingga akan ditranspor ke dalam sel oleh *glucose transporter 2* (GLUT2). Sedangkan GLUT2 itu sendiri akan memperlancar sel β dalam mengambil glukosa dalam darah, sehingga streptozotocin akan ikut diambil melalui proses pengambilan glukosa tersebut dan menyebabkan terjadinya alkilasi DNA. Alkilasi pada rantai DNA menyebabkan rantai DNA ribose putus sehingga terjadi kerusakan DNA [64]. Kerusakan DNA akan memicu produksi enzim poli (ADP-ribosilase) yaitu enzim yang digunakan untuk memperbaiki kerusakan DNA. Enzim poli (ADP-ribosilase) menyebabkan berkurangnya NAD^+ dan berkurangnya NAD^+ menyebabkan penurunan jumlah ATP sehingga terjadi sekresi insulin dan menginduksi hiperglikemia [65].

STZ juga berperan sebagai donor NO yang menyebabkan terjadinya radikal bebas dengan cara meningkatkan spesies oksigen reaktif (ROS) seperti radikal superoksida (O_2^\bullet), radikal hidroksil (OH^\bullet) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Radikal NO dalam bentuk bebas ataupun dalam bentuk senyawa peroksinitrit (ONOO^-), yang merupakan hasil reaksi NO dengan anion superoksida (O_2^-) bersifat sangat toksik terhadap sel β pankreas karena dapat menyebabkan kerusakan DNA pankreas [25]. NO juga dapat menghambat aktivitas enzim akonitase pada siklus krebs sehingga menyebabkan penurunan reaksi oksidasi glukosa dan pembentukan adenosine trifosfat (ATP). Peningkatan radikal superoksida menyebabkan peningkatan hidrogen

peroksida dan radikal hidroksil yang memiliki pengaruh tinggi dalam kerusakan pankreas dan hiperglikemia [25].

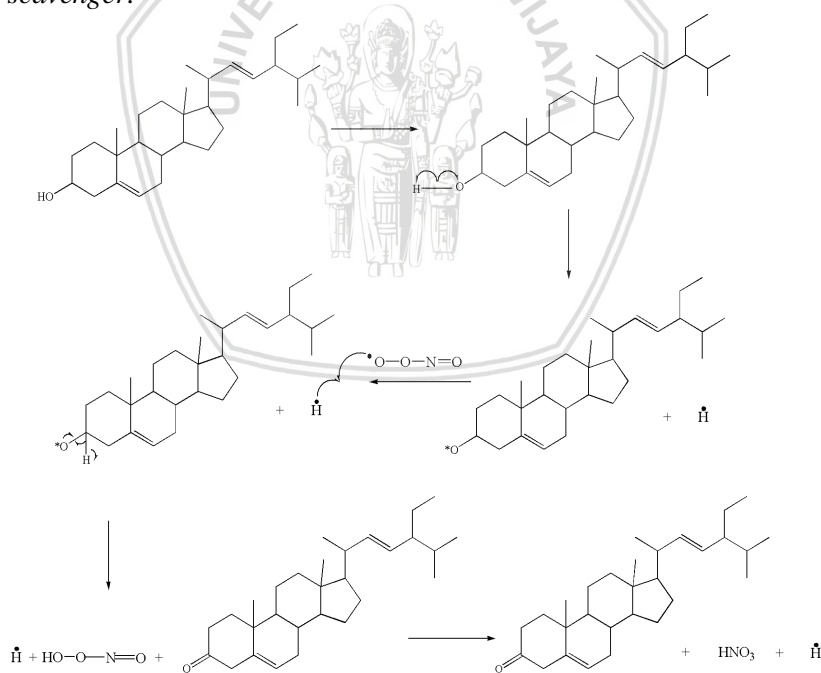


Gambar 4.2 Mekanisme STZ dalam merusak sel β pankreas pada tikus yang diinjeksi. MIT – mitokondria; XOD – xantin oksidase

Radikal bebas yang tidak memiliki pasangan akan bergerak bebas didalam tubuh dan mencari kestabilan dengan cara menyerang molekul terdekat untuk mendapat pasangan elektron yang menyebabkan terjadinya kerusakan bentuk molekul dan sel makromolekul. Sel makromolekul yang rentan terhadap radikal bebas adalah asam lemak tak jenuh seperti asam lemak tak jenuh panjang *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA). Radikal bebas akan menyerang PUFA sehingga ikatan karbon hidrogen PUFA melemah dan menjadi lebih mudah terjadi pemindahan hidrogen oleh radikal bebas. Radikal bebas kemudian akan membentuk radikal lipid melalui pemisahan atom hydrogen dan kemudian bergabung dengan O_2 yang akan menghasilkan radikal peroksil. Radikal peroksil akan berikatan dengan PUFA lain dengan cara memindahkan satu elektron yang akan

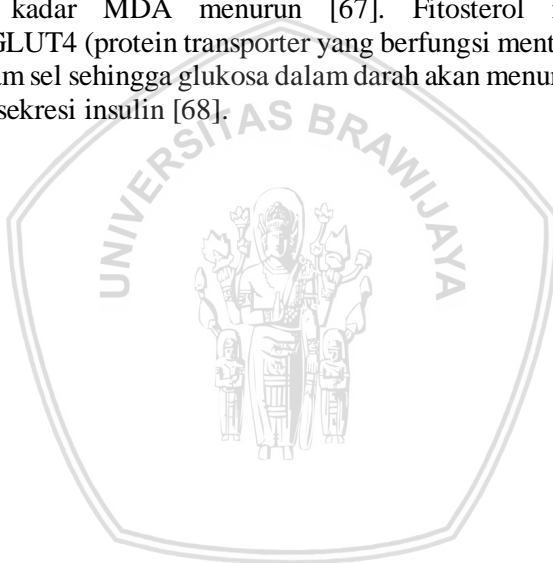
menghasilkan lipid hidroperoksida, dan lipid hidroperoksida akan membentuk produk berupa MDA (**Gambar 4.3**)[66].

Setelah diterapi dengan ekstrak etanol akar pletekan selama 21 hari, terjadi penurunan rata-rata kadar MDA pada kelompok terapi 250 mg/kg BB ($2,046 \pm 0,181$) $\mu\text{g/mL}$, kelompok terapi 375 mg/kg BB ($2,502 \pm 0,132$) $\mu\text{g/mL}$ dan kelompok terapi 500 mg/kg BB ($3,006 \pm 0,150$) $\mu\text{g/mL}$. Kelompok tikus DM tipe 1 yang diterapi dengan dosis 250 mg/kg BB mengalami penurunan kadar MDA yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok tikus DM tipe 1 yang diterapi dengan dosis 375 dan 500 mg/kg BB yaitu sebesar 50,55 %. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terapi ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) dosis 250 mg/kg BB berpengaruh sangat nyata terhadap penurunan kadar MDA pada pankreas tikus hasil induksi MLD-STZ karena ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) mengandung senyawa fitosterol yang berfungsi sebagai antioksidan yang dapat meredakan proses peroksidasi lipid dengan berperan sebagai *scavenger*.



Gambar 4.4 Dugaan mekanisme reaksi senyawa stigmasterol dalam meredam radikal bebas.

Ketika terdapat radikal NO dalam bentuk bebas atau senyawa peroksinitrit (ONOO^\bullet), fitosterol (stigmasterol) memiliki kemampuan mendonorkan atom H dari gugus hidroksil ($-\text{OH}$) dan akan berikatan dengan senyawa peroksinitrit menjadi ONOOH agar dapat distabilkan atau dinetralkan. Radikal O^\bullet yang masih menempel pada senyawa stigmasterol akan distabilkan oleh atom H di dalam strukturnya dan atom H yang lepas akan berikatan dengan atom H dari senyawa fitosterol lain atau senyawa peroksinitrit (ONOO^\bullet) lain dari STZ. Hilangnya efek radikal bebas menyebabkan penurunan stress oksidatif sehingga kerusakan sel akibat radikal bebas menurun dan menyebabkan kadar MDA menurun [67]. Fitosterol mampu mengaktivasi GLUT4 (protein transporter yang berfungsi mentransfer glukosa ke dalam sel sehingga glukosa dalam darah akan menurun dan meningkatkan sekresi insulin [68]).



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini diperoleh kesimpulan bahwa :

1. Ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) terbukti aktif sebagai antioksidan
2. Ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) sebagai antioksidan sangat kuat yang memiliki nilai IC_{50} sebesar $2,484 \pm 1,748 \mu\text{g/mL}$
3. Terapi ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) dapat menurunkan kadar MDA pada pankreas tikus diabetes hasil induksi MLD-STZ dengan dosis terbaik pada dosis 250 mg/kg BB sebesar 50,55 %

5.2 Saran

Studi lebih lanjut perlu dilakukan kajian lebih lanjut mengenai antioksidan mana yang bekerja lebih baik diantara komponen fitosterol dalam ekstrak etanol akar pletekan (*R. tuberosa*) dan optimasi dosis terapi dari dosis 125 mg/kg BB hingga 375 mg/kg BB.



DAFTAR PUSTAKA

- [1] Hartono, A. (2003). *Biokimia Harper*. Jakarta: EGC.
- [2] Takashi, H., Tran, P. O., LeRoy, E., Harmon, J. S., Tanaka, Y. & Robetson, R. P. (2004). d-Glyceraldehyde Causes Production of Intracellular Peroxide in Pancreatic Islets, Oxidative Stress, and Defective-Cell Functions via Nonmitochondrial Pathways. *Journal biology chemistry*, 279, 16 -23.
- [3] Sunardi, K. I. (2007). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap 1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl (DPPH). *Seminar nasional teknologi*, 1-9.
- [4] Adji, D. (2008). *Hubungan Konsentrasi Malondialdehid, Glukosa dan Total Kolesterol pada Tikus Putih yang Diinjeksi dengan Streptozotocin* (Tesis). Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Fakultas Kedokteran Hewan.
- [5] Hanachi, P., Moghadam, R.H., Latiffah, A.L. (2009). Investigation of Lipid Profiles and Lipid Peroxidation in Patients with Type-2 Diabetes. *European Journal of Science Research*, 28(1), 6-13.
- [6] Marjani, A. (2010). Lipid Peroxidation Alterations in Type 2 Diabetic Patients. *Pakistan Journal Biological Science*, 13(15), 723-730.
- [7] Fajriah, S., Darmawan, A., Sundowo, A. & Artanti, N. (2007). Isolasi Senyawa Antioksidan dari Etil Asetat Daun Benalu (*Dendrophthoe pentandra* L.) yang Tumbuh pada Inang Lobi-Lobi. *Jurnal Kimia Indonesia*, 2(1), 17-20.
- [8] Sunarni, T., Pramono, S. & Asmah, R. (2007). Flavonoid Antioksidan Penangkap Radikal dari Daun Kepel

- (*Stelechocarpus burahol*). *Majalah Farmasi Indonesia*, 18(3), 111-116.
- [9] Putra, D. P., Al Fatra, H. & Bakhtiar, A. (2010). Isolasi Senyawa Antioksidan dari Kelopak Bunga Nusa Indah (*Mussaenda frondosa* L.). *Jurnal Farmasi Indonesia*, 5(1), 48-56.
- [10] Van, Steenis. (1975). *Flora untuk sekolah di Indonesia*. Jakarta Pusat: PT. Pradnya Paramita.
- [11] Lenny, Sovia. (2006). *Senyawa flavonoida, fenilpropanoida dan alkaloida*. Medan: Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara.
- [12] Jannah, Hilyatul, I Made Sudarma & Yayuk Andayani. (2013). Analisis senyawa fitosterol dalam ekstrak buah buncis (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal chemical progress*, 6(2).
- [13] Rajan, M., Kumar, V. K., Kumar, V. S., Swathi, K. R. & Haritha, S. (2009). Antidiabetic, antihyperlipidaemic and hepatoprotective activity of methanolic extract of ruellia tuberosa linn leaves in normal and alloxan induced diabetic rats. *Jurnal gizi klinik Indonesia*, 5(3).
- [14] Cintari, L. K. & Utami, I. G. A. S. (2009). Effect of *R. tuberosa* extract to pancreatic, renal and liver histologic description of white rats (*rattus norvegicus*) with diabetes mellitus. *Jurnal gizi klinik Indonesia*, 5(3), 417.
- [15] American Diabetes Association (ADA). (2012). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care Journal*, 35(1), 64-71.

- [16] PERKENI. (2011). *Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia*. Jakarta: PERKENI.
- [17] Tjokroprawiro, Askandar. (2007). *Ilmu Penyakit Dalam*. Surabaya: Airlangga University Press.
- [18] Ozougwu, J. C., Obimba, K. C., Belonwu, C. D. & Unakalamba, C. B. (2013). The Pathogenesis and Pathophysiology of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 4, 46–57.
- [19] Fessenden, R.J. & J., S. Fessenden. (1986). *Kimia Organik Dasar Edisi Ketiga Jilid 1*. Terjemahan oleh A.H. Pudjaatmaka. Jakarta: Erlangga.
- [20] Artanti, N., Widayarti, R., Fajriah, S. (2009). Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Air dan Etanol Daun Benalu (*Dendrophthoe petandra* L.) yang Tumbuh Pada Berbagai Inang. *Jurnal Kimia Indonesia*, 11 (1), 39-42.
- [21] Supari, F.(1996). Radikal Bebas dan Patofisiologi Beberapa Penyakit Prosiding Senyawa Radikal dan Sistem Pangan: Reaksi Biomolekuler, Dampak Terhadap Kesehatan, dan Penangkalan. *Prodising Seminar Studi Pangan Dan Gizi Institut Pertanian Bogor Dan Kedutaan Besar Prancis*. Jakarta.
- [22] Rees, D. A. & Alcolado, J. C. (2005). Animal Models of Diabetes Mellitus. *Diabetic Medicine*, 22, 359-370.
- [23] Rowland, N. E. & Bellush, L. L. (1989). Diabetes Mellitus: Stress. *Neurochemistry and Behavior, Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 13(4), 199-206.

- [24] Bonner, Weir S., Trent, D. F., Honey, R. N. & Weir, G. C. (1981). Responses of Neonatal Rat Islets to Streptozotocin : Limited β -Cell Regeneration and Hyperglycemia. *Diabetes*, 30, 64-69.
- [25] Szkudelski, T. (2001). The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in β -Cells of The Rat Pancreas. *Physiology Research*, 50, 536-54.
- [26] Tormo, M. A., Gil-Exojo I., Romero, de Tejada A. & Campillo, J. E. (2006). White Bean Amylase Inhibitor Administered Orally Reduces Glycaemia in Type 2 Diabetic Rats. *British Journal of Nutrition*, 96(3), 539-544.
- [27] Jackerott, M., Moldrup, A., Thams, P., Galsgaard, E. D., Knudsen, J., Lee, Y. C. & Nielsen, J. H. (2006). STAT5 Activity in Pancreatic Beta-Cells Influences The Severity of Diabetes In Animal Models of Type 1 And 2 Diabetes. *Diabetes*, 55(10), 2705-2712.
- [28] Ou, B., Huang, D. J., Woodill, M. H., Flanagan, J. A. & Deemer, E. K. (2002). Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetable Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay: A Comparative Study. *Journal Agricultural Food Chemical*, 50, 3122-3128.
- [29] Buck, D. F. (1991). *Antioxidants*. In Journal Smith, editor. Food Additive User's.
- [30] Pratt, D. E. & B. J. F. Hudson. (1990). *Natural Antioxidants Not Exploited Commercially*. In B. J. F. Hudson, editor. Food Antioxidant. Elsevier Applied Science, London.

- [31] Amarowicz, R., Naczek, M. & Shahidi, F. (2000). Antioxidant Activity of Crude Tannis of Canola And Rapeseed Hulls. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 77, 957-961.
- [32] Prakash, A., Rigelhof, F. & Miller, E. (2001). Antioxidant Activity: Medallion Laboratories. *Analithycal Progress*, 19(2), 1-4.
- [33] Regina, Andayani, Yovita, Lisawati & Maimunah. (2003). *Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolat Total dan Likopen pada Buah Tomat (Solanum Lycopersium L.)*. Padang: Fakultas Farmasi Universitas Andalas.
- [34] Dehpour, A. A., Ebrahimzadeh, M. A., Fazel, N. S. & Mohammad, N. S. (2009). Antioxidant Activity of Methanol Extract of *Ferula Assafoetida* and Its Essential Oil Composition. *Grasas Aceites*, 60(4), 405-412.
- [35] Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. & Terao, J. (1998). HPLC Method for Evaluation of The Free Radical-Scavenging Activity of Foods By Using 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl. *Bioscience Biotechnology Biochemical*, 62, 1201-1204.
- [36] Chaitanya, B., Khrisna, Atigari, Diana, V., Babu, S. ravindra, Ravella, A., Vardhan & Jayasree. (2012). Hypolipidemic and Antioxidant Activity of *Ruellia Tuberosa* Linn. *International Journal of Pharmacy And Biological Sciences*, e-ISSN, 2230-7606.
- [37] Pateh, U. U., Haruna, A. K., Garba, M., Iliya, I., Sule, I. M., Abubakar, M. S. & Ambi, A. A. (2009). Isolation Of Stigmasterol, β -Sitosterol and 2-Hydroxyhexadecanoid Acid Methyl Ester from Rhizomes of *Stylochiton Lancifolius*. *Journal PharmacyScience*, 8 (1), 19-25.

- [38] Christie, W. W. (2001). *Sterols, Structure, Occurrence And Analysis*. Scotland: The Scottish Crop Research Institute.
- [39] Ni'mah, Dwiky Nur Zahrotun, Yuliana, Safitri & Wulan, Cahya Mailany. (2014). *Fitosterol*. [5](#) 045/makalah_pangan_fungsional. Diakses tanggal 22 Maret 2018.
- [40] Grotewold, E. (2006). *The Science of Flavonoids*. United States of America: Springer Science and Business Media Inc.
- [41] Robinson, T. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB Press.
- [42] Geissman, T. A. (1962). *The Chemistry of Flavonoid Compound*. Oxford: Pergamon Press.
- [43] Zuhra. (2008). Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Daun Katuk (*Sauropus androgonus*L.). *Jurnal Biologi Sumatera*, 3(1).
- [44] Pubchem. (2005). *Lupeol*. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. Diakses tanggal 24 Februari 2018.
- [45] Saleem, Mohammad. (2009). *Lupeol, A Novel Antiinflammatory and Anticancer Dietary Triterpene*. [www.ncbi.nlm.nih.gov](#). Diakses tanggal 24 Februari 2018.
- [46] Padmawinata & Kokasih. (1997). *Kimia Makanan edisi II*. Bandung: ITB.
- [47] Almtsier, S. (2003). *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Jakarta: Gedia Pustaka Utama.

- [48] Herlinda, Y. (1986). Hewan Percobaan Tikus Albino Strain Wistar di Unit Penelitian Gizi Diponegoro. *Majalah Kedokteran Indonesia*, 36(11), 491-495.
- [49] Wolfensohn, S. & Lloyd, M. (2013). *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*, 4th ed. West Sussex: Wiley-Blackwell.
- [50] Sihombing, Marice, Tuminah & Sulistyowati. (2011). Perubahan Nilai Hematologi, Biokimia Darah, Bobot Organ dan Bobot Badan Tikus Putih pada Umur Berbeda. *Jurnal veteriner*, 12(1), 1411- 8327.
- [51] Frandson, R. D. (1992). *Anatomi dan Fisiologi Ternak Edisi ke-4*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- [52] Boorman, G. A. & Beth, W. G. (1999). *Pathology of The Mouse*. USA: Cache River Press.
- [53] Sandberg, A. A. & Philip, D. H. (2008). Interactions of Exocrine and Endocrine Pancreatic Diseases. *Journal Pancreas*, 9(4), 541-575.
- [54] Pryor, W. A. (1976). *Free Radical Reactions in Biological Systems vol. IV*. New York: Academic Press.
- [55] Conti, M., Morand, P. C., Levillain, P. & Lemonniera, A. (1991). Improve Fluorometric Determination of Malonaldehyde. *Journal of Clinical Chemistry*. 37, 1273-1275.
- [56] Zakaria, F. R., Susanto, H. & Hartoyo. (2000). *Pengaruh Konsumsi Jahe (Zingiber officinale roscoe) terhadap Kadar Malonaldehid dan Vitamin E Plasma pada Mahasiswa Pesantren Ulil Albaab Kedung Badak*. Bogor: Teknologi Industri Pangan.

- [57] Favier, A. E. (1982). *Biological Indicators of Oxidative Stress in Humans*, Champaign Illinois.
- [58] Belleville-Nabet, F. (1996). Zat Gizi Antioksidan Penangkal Senyawa Radikal Pangan dalam Sistem Biologis. *Prosiding Seminar Senyawa Radikal dan Sistem Pangan: Reaksi Biomolekuler, Dampak Terhadap Kesehatan dan Penangkalan*, CFNS-IPB dan Kedutaan Besar Prancis. Jakarta.
- [59] Ressang, A. A. (1984). *Patologi Khusus Veteriner Edisi 2*. Denpasar: Percetakan Bali.
- [60] Winarsi, H. (2001). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- [61] Ghosal, M. & Mandal, P. (2012). Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Two Selected 'Bihi' Fruits Use as Vegetables in Darjeeling Himalaya. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 4(2).
- [62] Nurjanah, L. I. & Asadatun, Abdullah. (2011). Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Kerang Pisau (*Solen spp*). *Jurnal Ilmu Kelautan*, 16(3), 119-124.
- [63] Sharma, S. B., Nasir, A., Prabhu, K. M., Murthy, P. S. & Dev, G. (2003). Hypoglycemic and Hypolipidemic Effect of Ethanolic Extract of Seeds of *Eugenia Jambolana* in Alloxan Diabetic Rabbits. *Journal Ethnopharmacol*, 85(2-3), 201-6.
- [64] Schnedl, W.J., Ferber, S., Johnson, J. H. & Newgard, C. B. (1994). STZ Transport and Citotoxicity: Specific Enhancement in GLUT2-Expressing Cells. *Diabetes*, 43, 1326-1333.

- [65] Wiwanitkit, V. (2007). Glucosuria and Albuminuria in Diabetic Nephropathy: A consideration at Nanolevel. *Journal Diabetes*, 21, (2-3), 164-5.
- [66] Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., Paniz, C. & Garcia, G. S. S. C. (2009). Importance of The Lipid Peroxidation Biomarkers and Methodological Aspectd for Malondialdehyde Quantification. *Quim Nova*, 32(1), 169-174.
- [67] Aulanni'am, Anna, Roosdiana, Rahmah & Nur, L. (2012). The Potency of *Sargassum duplicatum* Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in *Rattus norvegicus*. *Journal of Life Science*, 6, 144-154.
- [68] Babu, Pon Velayutham Anandh, Liu, Dongmin & Gilbert, Elizabeth R. (2013). Recent Adbances in Understanding The Anti-diabetic Actions of Dietary Flavonoids. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 1777-1789.

